Fast ID Genomic DNA 抽出キット
取扱説明書

Genomic DNA Extraction Kit

INSTRUCTION MANUAL

＜ 目 次 ＞

	ページ
キット紹介	2
キットに含まれる内容	2
保存条件	2
推奨機器及び試薬	2
プロトコールの紹介	2
プロトコールの概要	3
DNA 抽出手順	3
フローチャート	4
製品安全データシート（MSDS）	5
製品保証	5
製品の使用制限	5
品質管理	5
技術サポート	5
免責条項	5
トラブルシューティング	6

ビューローベリタスジャパン株式会社　横浜分析センター

〒224-0033　神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東 4-5-17

TEL:045-949-4664　FAX:045-949-4621

E メール：cpsinfo.yok@jp.bureauveritas.com

【キット紹介】

Fast ID は、農産物や加工品等の広範囲なサンプルから、極めて高純度な DNA を高収量で抽出することが可能です。Fast ID は特に加工食品から高収量 DNA を得られるよう開発されています。抽出・精製された DNA は PCR 増幅に限らず、制限酵素処理、クローニング及びシーケンス解読を含む、あらゆる分子生物学的手法に適しています。PCR 反応をベースとした遺伝子組換え作物検査キットと共に使用する場合、PCR 増幅を最適化し、阻害反応を最小限に抑えることのできる Fast ID DNA 抽出キットを推奨します。

Fast ID は様々なタイプのサンプルから DNA を抽出することが可能です。Fast ID Genomic DNA 抽出キットは主に種子、穀物、果実、野菜、加工食品に、Fast ID Ultra DNA 抽出キット（別売）は複数原材料からなる製品や大豆タンパク質等の高度加工食品の定量分析に適しています。Fast ID は強力な変性剤と DNA 選択試薬を含んでおり、DNA の劣化を防ぎ、PCR 反応を阻害してテンプレート DNA とプライマーによる人工的合成に影響するような物質の混入を除去するように設計されています。

【キットに含まれる内容】

キット名	カタログ番号	
Fast ID Genomic DNA Extraction	50 回抽出用	200 回抽出用
（内容） ・ Proteinase K ・ Genomic Lyse buffer ・ Genomic Bind buffer ・ Genomic Wash buffer ・ DNA Binding Columns ・ 1xTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0)	K1-0001-0050	K1-0001-0200

【保存条件】

Fast ID キットに含まれるバッファーはすべて室温（20－25℃）にて保存してください。この条件下で一年間は安定してご使用頂けます。 Proteinase K を指定の濃度に溶解した後は、冷蔵（2－8℃）にて保存してください。

【推奨機器及び試薬】（本キットには含まれていません）

- 60－65℃インキュベーター
- バキュームマニホールド（例：QIAvac 24・・・24 本のカラム処理が可能）
- マイクロ遠心分離機（1.5mL 及び 2.0mL チューブが使えるもの）
- RNase（必要に応じて使用）
- 75%エタノール
- クロロホルム（必要に応じて使用）
- 分子生物学グレードの滅菌水

【プロトコールの紹介】

他の多くの DNA 抽出キットとは異なり、Fast ID は広範囲のサンプルタイプに応用できます。Fast ID による実験を通して、様々なタイプのサンプルから DNA を効率良く抽出することが実証されています。許容誤差は重量、質量共に±10%です。

【プロトコールの概要】

1. プロトコールの使用に先立ち、試料の均質化を十分行うことを推奨します。
2. サンプリングした試料を Genomic Lyse buffer でインキュベートすることにより、溶解した細胞からタンパクや DNA、その他細胞成分がバッファー中に溶け出します。Proteinase K はサンプル中のタンパク質を分解するために添加します。
3. DNA を含む上澄み液に Genomic Bind buffer を加えた後、DNA 吸着カラムに通します。
4. DNA 吸着カラムを専用バッファーおよびエタノール溶液で洗浄することにより、不要な汚染物質を除きます。
5. DNA は 1xTE バッファーに溶出されて、抽出が完了します。
6. 最善の結果を得るためには、当キット指定の試薬をご使用下さい。

【DNA 抽出手順】

キットに添付の Proteinase K を全量、純水（分子生物学実験グレード[Sigma]または組織培養グレード[Gibco]などの水）で溶解させ、20mg/ml の Proteinase K を調製する。添加する水の量は以下の通り:

Kit Size	添加水量
50 回抽出用	500μl
200 回抽出用	2000μl

※Fast ID キット使用時に RNase（別途準備）を添加する場合、1mg/ml に調製する。

1） 1 回の抽出につき 1000μl の Genomic Lyse buffer を使用し、予め Genomic Lyse buffer に 10μl の Proteinase K 溶液を添加し、優しく混和してから使用する。必要に応じて RNase を添加する場合は、「トラブルシューティング：RNA 汚染が疑われる」を参照。

Note： Genomic Lyse buffer に沈殿が生じていた場合（低温にさらされた際に発生）は、20℃～30℃に温めて沈殿物がなくなるまで優しく混和する。

2） 粉砕、均質化したサンプル 200mg を 2ml チューブに採取し、ステップ 1 で作成した 1000μl の Genomic Lyse buffer 混合溶液を添加する。

3） 全体がなじむまで、十分にボルテックスで撹拌する。

4） 65℃で 10～30 分間インキュベートする。インキュベート中は数回チューブを転倒混和する。

5） マイクロ遠心分離機で 5 分間、10,000rpm で遠心する。

6） 遠心上清 500μl を新しい 2ml のチューブに移し取る。

Note：遠心上清の量が 500μl に満たない場合、沈殿物を除き、取れるだけの上清を移し取る。浮遊物がある場合には再度遠心し、これを新しいチューブに持ち越さない。
加工品や複合原材料品などサンプルの状態によっては、このステップ後にクロロホルム処理を加えると DNA 抽出が良好になる（末尾の※Note-2.を参照）。

7） 遠心上清と等量の Genomic Bind buffer を加え、ボルテックスで撹拌する。

Note：まれに試薬の薄赤色が黄色に変化するが、その場合には pH 指示紙で pH 値を確認する。必要に応じて 1N HCl を加え pH5～5.5 に調整する。

8） マイクロ遠心分離機で 5 分間、10,000rpm で遠心する。

9） 遠心上清 650μl を DNA Binding Column に添加し（サンプルによっては沈殿が生じる場合があるが、これは持ち越さない）、バキュームマニホールド又は、マイクロ遠心分離機で 1 分間、10,000rpm 以下（推奨 8,000rpm）で Column を通過させる。濾過液は捨てる。残った混合液は再度（同一の）DNA Binding Column に通しても良い。

Note：もし装置内に Genomic Bind buffer が飛散した場合はきれいにふき取る（Genomic Bind buffer 中に含まれる成分により機器が腐食することがある）。

10） DNA Binding Column に Genomic Wash buffer を添加、Column を洗浄し、濾過液を捨てる。バキュームマニホールドを使用の場合は 800μl をマイクロ遠心分離機で 2 分間、10,000rpm 以下（推奨 8,000rpm）で行う場合は 650μl の Genomic Wash buffer を用いる。

11） DNA Binding Column に 75%エタノールを添加、Column を洗浄し、濾過液を捨てる。バキュームマニホールドを使用の場合は 800μl を、マイクロ遠心分離機[30 秒間、10,000rpm 以下（推奨 8,000rpm）]で行う場合は 650μl の 75%エタノールを用いる。

12） 11のステップを 2 回繰り返す（75%エタノール処理は計 3 回実施する）。

13） マイクロ遠心分離機にて 1 分間、10,000rpm で遠心し、DNA Binding Column のメンブレン部にエタノールが残存しないように乾燥させる。乾燥後は直ちに14のステップに移る。

14） DNA Binding Column を新しい 1.5ml のチューブに乗せ換える。

15） 1xTE を適当量（使用目的に合わせる。100～200μl が妥当量）、DNA Binding Column に添加する。

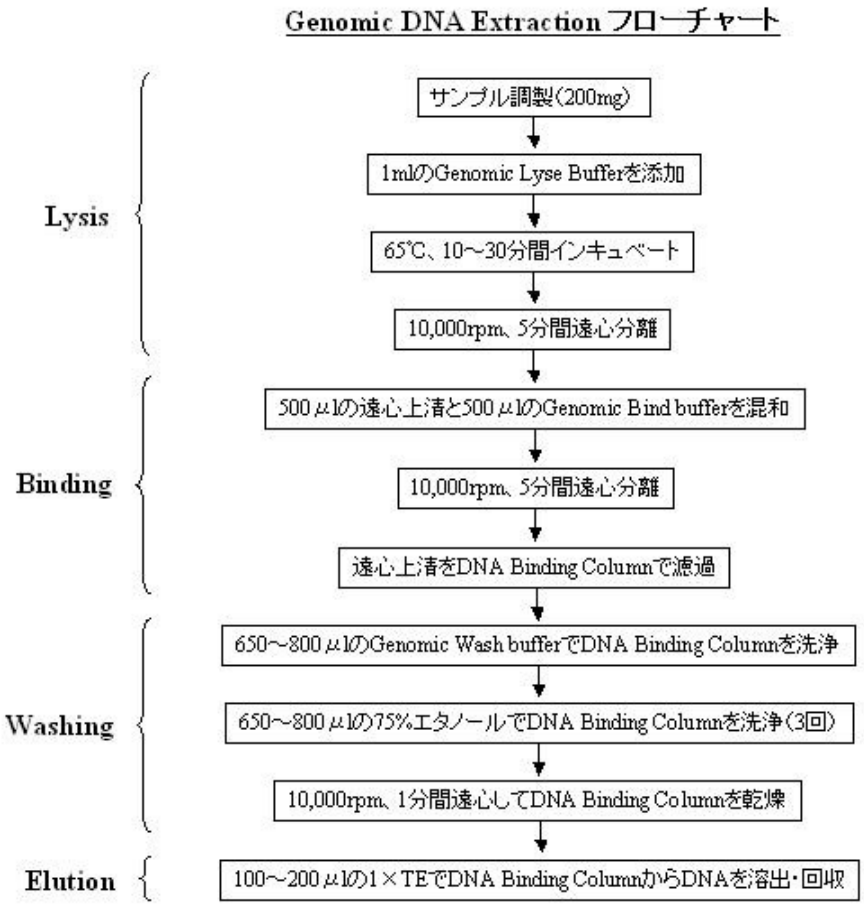
16） 65℃で 5～10 分間インキュベートし、DNA Binding Column から DNA を溶出する。

17） マイクロ遠心分離機で 5～30 秒間、10,000rpm（推奨 8,000rpm）で遠心し、1.5ml のチューブに DNA 溶液を回収する。

※Note：DNA 収量や純度が良好でない場合は以下を参考にする。

1. DNA 収量が低い場合はトラブルシューティングを参照。
2. 原材料が複雑なサンプルの場合、クロロホルム処理を追加すると DNA 収量や純度が向上する場合が多い。ステップ5の後、取れるだけの遠心上清と 1.2～1.5 倍量のクロロホルムを添加して激しく混和する。その後、マイクロ遠心分離機で 5～10 分間、10,000rpm 以上で遠心し、ステップ6以降を続ける。
3. ステップ 7 で遠心上清と Genomic Bind buffer を混ぜ、充分撹拌した後で 2-プロパノールを添加すると DNA 収量が向上する場合がある。遠心上清：Genomic Bind buffer：2-プロパノール=1：1：1 の比で混合する。

【フローチャート】



【製品安全データシート（MSDS）】

Fast ID の製品安全データシート（MSDS）は、ウェブサイト（www.fastidkit.com）からダウンロードしてご覧頂くことができます。

【製品保証】

この製品は取扱説明書に記載された通りに機能することを本キットの開発元である Genetic ID が保証します。Genetic ID は製品またはその一部について、操作性や性能の向上のために変更する権利を持ちます。本キットがご購入者の使用目的に適うか否かは、各ご購買者の責任において確認をお願い致します。この製品について何らかの理由でご満足頂けない場合には、弊社までお問い合わせください。誤用および乱用を除き、品質不良がある場合には製品をお取替え致します。

【製品の使用制限】

本キットは研究・調査・品質管理目的のみにご使用頂けます。本キットを医療上の診断や投薬等の医療行為を目的として使用することは認められておりません。製品に付属するすべてについて、この取扱説明書に従って使用し、適切に保管してください。廃棄方法については各市町村の定める規則に従って適正に処理してください。

【品質管理】

Fast ID は Genetic ID NA, Inc.社によって開発された製品です。Fast ID は ISO17025 認定を取得した検査機関にて使用されており、製品に付属するすべてについて出荷前に性能検証試験が実施されています。

【技術サポート】

本キットに関して不明な点がございましたら、メール： cpsinfo.yok@jp.bureauveritas.com もしくは電話：045-949-4664 にて弊社までお問い合わせください。

【免責条項】

上記記載事項は我々のこれまでの知見に基づき、正確を期しているものと信じております。製品を使用した結果について、我々は法的責任を負うものではありません。個々の使用目的への適性確認は、使用者が独自に判断いただくものと致します。Genetic ID NA, Inc.社、及び系列会社は第三者のいかなる損失または損害に対しても、法的責任を負うものではありません。

また、このキット製品を開封した場合、製品に含まれる DNA 抽出技術のリバースエンジニアリング、または模倣行為を行わないことに同意したものと見なします。

【トラブルシューティング】

DNA 収量が不十分	・ サンプルの粉砕と均質化が完全であることを確かめる(種子サンプルであれば全て粉末化し、葉組織であればビーズ撹拌または Genomic Lyse buffer と共に粉砕する)。 ・ 収量・純度共に最大限の DNA を得るために、ステップ3のボルテックスが重要。 ・ インキュベート時間は指示した時間の最大値が最も望ましい。 ・ ステップ9で全ての溶液がメンブレンを通過したことを確認する。 ・ ステップ9で DNA Binding column のフロースピードを小さくすると DNA 収量が増える場合がある。マイクロ遠心分離機を用いる場合は、最小 1000rpm で上限 5 分まで遠心することが推奨される。あるいは、このステップのみ重力にまかせるのも有効であるが、この場合、サンプル液が 5～15 分でカラムを通過しなくてはならない。 Note: 洗浄ステップでは時間を無駄にすることなくフロースピードを上げることも可能。 ・ サンプルサイズは 1gまで増やして良い。使用する Genomic Lyse buffer の量も相当量に増やす。 ・ タンパク質の豊富なサンプルの場合 Proteinase K の使用量を増やすことで DNA 収量も上がる。
DNA Binding Column のフロースピードが遅い(詰まる)	・ ステップ9で、カラムに通すため溶液は透明でなければならない。濁りがある場合はステップ8で遠心する時間を延ばす。 ・ ステップ5の後、クロロホルム処理を追加することが効果的である。クロロホルム処理は複数回繰り返すことで、より良好になることがある(二回目からはクロロホルムは等量程度で可)。
DNA 抽出手順が長い	・ 一般的に、5 サンプルを 2 時間以内で抽出できる(トラブルシューティング内の「DNA 収量が不十分」の項目にある場合を除く)
DNA Binding Column のメンブレンが変色する	・ メンブレンに結合した DNA から色素成分を取り除くために、Genomic Wash buffer で 2 回、75%エタノールで 3 回、更に 100%エタノールで 1 回洗浄する。
PCR 阻害	・ 塩のキャリーオーバーによって PCR 阻害が起こり得る。エタノールによる洗浄ステップで確実に塩を取り除くことが重要になる。75%エタノールで洗浄する際はカラムの上部まで常に浸るようにする。2 回目までのエタノール洗浄ではカラムの縁を洗うことを推奨する。 ・ サンプルによって PCR を阻害する成分を多く含むものがある。この場合、Genomic Wash buffer での洗浄を 1 回増やすことを薦める。 ・ ステップ5の後、クロロホルム処理を加えるで阻害物質が取り除かれることがある。
DNA の断片化	・ ボルテックスによる撹拌を最小限に留める。重要なのはステップ3のボルテックス撹拌のみで、その他ではボルテックスの代わりに 10 回程度の転倒混和を行っても良い
RNA 汚染が疑われる	・ 予め Genomic Lyse buffer に 10μl の RNAse 溶液(1mg/ml)を加えて、優しく混和する。1ml のバッファーをサンプルに加え、ボルテックスで撹拌後、室温で 10～30 分間インキュベートする。その後で Proteinase K を 10μl 加えてステップ3へと続ける

201410